

На правах рукописи

Чижова Надежда Дмитриевна

Влияние сочетания точечных мутаций L100P и Q31L в гене *Disc1* на проявление аффективных и когнитивных аспектов поведения у мышей

1.5.5 – Физиология человека и животных

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Новосибирск, 2024

Работа выполнена в ФГБНУ «Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины» (НИИНМ, г. Новосибирск)

Научный руководитель –

д-р биол. наук, доцент, Тамара Геннадьевна Амстиславская

Официальные оппоненты:

Людмила Павловна Смирнова, канд. мед. наук, старший науч. сотр. лаб. молекулярной генетики и биохимии НИИ психического здоровья ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН».

Алла Борисовна Салмина, д-р мед. наук, профессор, главный науч. сотр., заведующая лаб. нейробиологии и тканевой инженерии отдела молекулярных и клеточных механизмов нейропластичности Института мозга ФГБНУ «Научный центр неврологии» (г. Москва).

Ведущая организация – Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Челябинский государственный университет» (г. Челябинск).

Защита состоится «_____» _____ 2024 года в _____ на заседании диссертационного совета _____, созданного на базе ФГБНУ НИИНМ по адресу: 630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 4.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте НИИНМ <https://neuronm.ru>.

Автореферат разослан _____ 2024 года.

Ученый секретарь диссертационного совета
д-р биол. наук

М.А. Тихонова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность

Поведение живых существ представляет сложный процесс ответа на факторы как внешней, так и внутренней среды, затрагивающий все уровни организации организма. В регуляции поведения задействовано множество внутриклеточных процессов, значительная часть которых универсальна для разных видов. В связи с этим изучение механизмов, от регуляции транскрипции генов до передачи сигналов между нейронами, лежащих в основе поведенческих реакций животных, широко применяется при исследовании молекулярно-генетических основ поведения людей. Так, моделирование психических расстройств человека на лабораторных животных является одним из ключевых методов в их изучении и широко используется для разработки новых методов профилактики и терапии, в том числе и фармакологических вмешательств.

В связи с растущим объемом знаний о генетике психических расстройств все более важной задачей для нейрофизиологии и медицины становится выявление сложных, комплексных взаимодействий генов, сочетаний их аллелей и среды. Современные исследования на моделях, помимо выявленных генов-кандидатов, также фокусируются на генах нейроразвития, поскольку это позволяет изучать предполагаемые подходы к предупреждению заболевания. Не менее важным остается и поиск новых терапевтических методов лечения. В частности, в связи с часто встречающейся устойчивостью к применяемым препаратам и недостаточно эффективной, либо сопровождающейся побочными эффектами, терапии актуален и поиск новых фармакологических препаратов для лечения шизофрении и аффективных расстройств.

Одним из множества генов, ассоциированных как с нейроразвитием, так и с психическими расстройствами у людей, является ген *DISC1* (Disrupted-In-Schizophrenia-1). Известно, что у людей максимальная степень его экспрессии в ЦНС приходится на пре-, неонатальный и пубертатный периоды жизни, то есть во время закладки, развития и активного изменения мозга. Доказано, что белок *DISC1* взаимодействует и модулирует активность большого количества других клеточных белков, множество из которых играет важную роль в нейрогенезе, миграции и росте нейронов, формировании дендритных шипиков, а также в сигнальной коммуникации внутри клетки и в синаптической пластичности (Camargo et al., 2007; Bradshaw & Porteous, 2012). Эти данные свидетельствуют о вовлеченности *DISC1* в процессы нейрогенеза и нейропластичности (Brandon & Sawa, 2011), что обуславливает актуальность исследований по выявлению роли *DISC1* интерактома в развитии психических расстройств, включая шизофрению,

депрессию, биполярное аффективное расстройство и посттравматическое стрессовое расстройство. Такое разнообразное участие *DISC1* в развитии мозга и его пластичности является предпосылкой для создания генетических моделей на лабораторных животных.

Генетическая архитектура шизофрении состоит из множества мультипликативно взаимодействующих между собой аллелей генов, ассоциированных с данным психическим расстройством (Jones & Faham, 2005; Wray & Visscher, 2010). Вероятность проявления шизофрении возрастает с увеличением количества таких аллелей риска. Таким образом, в патогенез шизофрении значительный вклад вносят генетические (внутренние) факторы и заболевание рассматривают преимущественно как сложное высокополигенное расстройство. К внешним факторам риска шизофрении, наряду со стрессогенными экологическими и социальными условиями, употреблением алкоголя и психоактивных веществ, относятся пре- и неонатальные воздействия. Так, некоторые состояния материнского организма во время беременности (например, активация иммунного ответа в организме матери (Clarke et al., 2009; Brown & Derkits, 2010), депрессия у матери (Mäki et al., 2010)) могут способствовать развитию шизофрении у плода во взрослом состоянии, особенно при взаимодействии этих состояний с генетическими факторами риска. Таким образом, шизофрения является мультифакторным заболеванием, предпосылки к которому складываются в процессе нейроразвития (Buka & Fan, 1999; Lewis & Levitt, 2002; Rabe-Jablonska, 2005; Коцюбинский и др., 2016).

Депрессия, с другой стороны, считается заболеванием, являющимся в большей степени результатом воздействия внешней среды (психотравмирующие события, недостаток сна, социально-экономические факторы, заболевания). Тем не менее, доказан и вклад наследственности. Считается, что предрасположенность к депрессии определяется генетическими и психологическими факторами, а к её реализации приводят неблагоприятные внешние условия (Muñoz et al., 2012).

В целом, генетические и средовые факторы совместно оказывают влияние на патогенез как шизофрении, так и депрессии.

Ряд генетических моделей, созданных на основе мутаций в гене *Disc1* у грызунов, является подтвержденными моделями шизофрении и депрессии, в том числе линии мышей *Disc1-L100P* и *Disc1-Q31L*, соответственно. С помощью сочетания у мышей двух обозначенных выше мутаций (компаунд-гетерозиготы *Disc1^{L100P/Q31L}*) можно определить закономерности их совместного влияния на проявления эндофенотипов шизофрении и депрессии у мышей, что ранее не было исследовано. В дополнение к этому, данная работа подразумевает отделение потенциального влияния матерей, несущих мутации *Disc1-*

L100P и *Disc1-Q31L* в гомозиготном состоянии, и проявляющих, соответственно, шизофрено- или депрессивноподобное поведение, что позволит выделить непосредственные эффекты данных мутаций, оказываемые на поведенческие особенности их потомков с двумя мутациями.

Современная гипотеза нейроразвития шизофрении предполагает наличие этиологических и патологических факторов задолго до манифестации заболевания, поэтому поиск новых потенциальных методов её превентивной коррекции становится все более актуальным. Благодаря такому подходу одним из направлений исследований стали полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК). На основе проанализированной литературы можно заключить, что применение ω -3 ПНЖК возможно в качестве терапевтической профилактики при субпороговых психотических состояниях и после перенесенных травм или инсульта, для уменьшения риска развития заболевания (Amminger et al., 2015; Pawełczyk et al., 2016). Предполагаемые противовоспалительные свойства эйкозаноидов, синтезируемых организмом из ω -3 ПНЖК, и установленная взаимосвязь между нейровоспалительными процессами и развитием депрессии позволяют рассматривать ω -3 ПНЖК и в качестве потенциального антидепрессанта (Lang & Borgwardt, 2013; Husted et al., 2016; Trebatická et al., 2017).

Классическое действие антипсихотиков (АП) связано со снижением дофамина, однако тенденцией современной фармакологии является воздействие на отдельные звенья патологического процесса. Стриатумспецифичная протеин тирозинфосфатаза (STEP), кодируемая геном *PTPN5*, является важным регулятором функции NMDAR (N-метил-D-аспарататных рецепторов), то есть принимает участие в глутаматной передаче сигналов, а экспрессируясь в дофаминергических нейронах – в передаче сигналов по ERK-пути, опосредованной рецепторами дофамина 2 типа (D2R). Также STEP участвует в регуляции развития дофаминергических нейронов, а нарушения её регуляции вовлечены в общий механизм когнитивных нарушений при различных заболеваниях. Таким образом, фермент представляется перспективной мишенью для направленного воздействия (Fitzpatrick & Lombroso, 2011). При шизофрении именно когнитивные симптомы хуже поддаются купированию современными антипсихотиками, поэтому актуальны исследования блокаторов STEP на моделях шизофрении в качестве потенциальных антипсихотиков. В данной работе проводится исследование одного из новых соединений ряда бензопентатиепинов (синтезированных в НИОХ СО РАН), способного блокировать STEP, на гомозиготных мышцах линии *Disc1-L100P* (генетической модели шизофрении).

Целью работы является изучение влияния точечных мутаций L100P и Q31L в гене *Disc1* на особенности проявления эмоционального, социального и когнитивного поведения у гомозиготных и компаунд-гетерозиготных мышей обоих полов, в зависимости от генотипа матери, а также оценка эффекта диеты, насыщенной ω -3 ПНЖК, и введения блокатора STEP (стриатумспецифичной протеин тирозинфосфатазы) на поведение мышей с данными мутациями.

Задачи исследования:

1. Исследование особенностей процесса угашения условной реакции пассивного избегания у гомозиготных мышей *Disc1*-L100P и *Disc1*-Q31L обоих полов.
2. Изучение фенотипических особенностей проявления эмоционального, социального и когнитивного поведения у самцов и самок *Disc1*^{L100P/Q31L} с определением вклада генотипа матери.
3. Исследование эффекта диеты, насыщенной ω -3 ПНЖК, на поведение мышей *Disc1*^{L100P/Q31L}.
4. Оценка влияния блокатора STEP – стриатумспецифичной протеин тирозинфосфатазы – на поведение гомозиготных мышей *Disc1*-L100P.

Методология диссертационного исследования

В работе использовали мышей контрольной линии C57BL/6 и с мутациями в гене *Disc1*: линии *Disc1*-L100P и *Disc1*-Q31L, проявляющие шизофрено- и депрессивноподобное поведение, соответственно. Фенотипирование мышей, сочетающих обе мутации в гене *Disc1*, проводили в следующих поведенческих тестах: «приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ), «открытое поле» (ОП), тест на закапывание шариков, «Т-образный лабиринт», тест на социальную мотивацию и распознавание, тест «вынужденное плавание», тест на сенсорно-моторную фильтрацию информации (РРІ), тест на выработку памяти о страхе (УРПИ), латентное торможение (ЛІ).

Также были проведены тесты на угашение УРПИ у гомозиготных самок и самцов данных линий и тест «вероятностное обучение при 80% вознаграждении» у гомо- и гетерозиготных по мутации *Disc1*-L100P самцов.

Эффект ω -3-ПНЖК-обогащенной диеты на поведение мышей исследовали в ПКЛ, ОП, «Т-образном лабиринте», тесте на социальную мотивацию, «подвешивании за хвост», РРІ и тесте на память страха.

Синтезированное в НИОХ СО РАН соединение из ряда бензопентатиепинов

(препарат под шифром ТС-2051), блокатор STEP, изучали в качестве потенциального антипсихотика на гомозиготных самцах линии *Disc1*-L100P в поведенческих тестах ОП, PPI и LI.

Положения, выносимые на защиту

1. Мутации L100P и Q31L в гене *Disc1* вовлечены в угашение условной реакции пассивного избегания. Более быстрый его процесс отмечен у самцов L100P-hom, задержка характерна для самцов Q31L-hom, а у самок обеих линий показано отсутствие полного угашения за весь тестируемый период.

2. Сочетание в гетерозиготном состоянии двух мутаций L100P и Q31L в гене *Disc1* изменяет выраженность аффективных реакций – вызывает гиперактивность у самок в стрессорных условиях и усиливает компульсивность тех самок, матери которых гомозиготны по L100P, и самцов, чьи матери гомозиготны по Q31L. У компаунд-гетерозигот обоих полов, матери которых были гомозиготными по мутации Q31L, снижено престаимпульное торможение реакции вздрагивания.

3. Диета, обогащенная ω -3 ПНЖК, восстанавливает нарушенный PPI у компаунд-гетерозиготных самцов, но не у самок, до соответствующих значений в контроле (дикий тип).

4. Блокада стриатумспецифичной протеин тирозинфосфатазы (STEP) у гомозиготных самцов мышей *Disc1*-L100P увеличивает PPI до значений, демонстрируемых мышами контрольной линии, подтверждая связь STEP-опосредованных регуляций с когнитивным поведением.

Научная новизна

В работе впервые исследованы особенности угашения условной реакции пассивного избегания у мышей линий *Disc1*-L100P и *Disc1*-Q31L и обнаружено более быстрое угашение реакции страха у самцов *Disc1*-L100P, задержка угашения у самок *Disc1*-L100P и более медленное угашение у самцов и самок *Disc1*-Q31L, вплоть до полного его отсутствия у последних.

Впервые экспериментально обоснована значимость моделей, несущих обе мутации (*Disc1*-L100P и *Disc1*-Q31L) в гетерозиготном состоянии, для исследования превентивных подходов к предупреждению шизофрении и её лечению на раннем этапе.

Установлено, что у самцов и самок мышей, несущих обе мутации, наблюдается дефицит престаимпульного торможения реакции вздрагивания в случае, если их матери были гомозиготами по мутации *Disc1*-Q31L. Также впервые доказано дифференцированное влияние генотипа матери на компульсивноподобное поведение

потомков разного пола. У самцов, чьи матери были гомозиготами по *Disc1*-Q31L, и у самок, чьи матери были гомозиготами по *Disc1*-L100P, усиливалось проявление компульсивноподобного поведения.

На компаунд-гетерозиготных мышах впервые показано, что диета, обогащенная ω -3 ПНЖК, оказывает корректирующее действие на проявления таких признаков шизофреноподобного поведения у самцов *Disc1*^{L100P/Q31L}, как дефицит PPI, до значений у мышей дикого типа, тогда как у самок она уменьшает количество спонтанных чередований в Т-образном лабиринте, свидетельствуя о нарушении рабочей памяти.

Впервые был установлен антипсихотический эффект блокатора STEP TC-2051 (соединения из ряда бензопентатиепинов, синтезированного в НИОХ) при его внутрибрюшинном введении в дозе 10 мг/кг гомозиготным мышам *Disc1*-L100P – увеличение PPI до контрольных значений и снижение гиперактивности этих мышей в открытом поле.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов подтверждается тем, что научные положения и выводы обоснованы и получены с использованием системного подхода к решению поставленных задач. При формировании экспериментальных групп соблюдали правила рандомизации и достаточности выборок в соответствии с основными регламентами работы с лабораторными животными. Эксперименты проводили на высокотехнологичном оборудовании с использованием современных методов исследований. Полученные результаты были подвергнуты адекватному статистическому анализу.

Материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на; Международном форуме по когнитивным нейронаукам «Cognitive Neuroscience – 2019» (Екатеринбург, 2019), IV Межрегиональном фестивале "Молодой профессионал Сибири" (Кызыл, 2019), The Twelfth and Thirteenth International Multiconference «BIOINFORMATICS OF GENOME REGULATION AND STRUCTURE/SYSTEMS BIOLOGY (BGRS/SB-2020, BGRS/SB-2022)» (Novosibirsk, 2020 & 2022), 60-ой Международной научной студенческой конференции (МНСК-2022) (Новосибирск, 2022), V Российской конференции с международным участием «Современные проблемы биологической психиатрии и наркологии» (Томск, 2023) и XXIV съезде Физиологического Общества им. И.П. Павлова (Санкт-Петербург, 2023).

Теоретическая и научно-практическая ценность работы

Фундаментальной ценностью данной работы является расширение знаний о сочетанном влиянии мутаций в гене *Disc1* на проявления шизофреноподобного поведения

у мышей и исследование подходов к их коррекции: потребления корма, обогащенного ω -3 ПНЖК, и применения блокатора STEP, оказывающего антипсихотическое действие, на генетически детерминированной модели шизофрении (линия *Disc1*-L100P).

Практическая ценность полученных результатов заключается в возможности использования линии *Disc1*-Q31L в качестве потенциальной модели посттравматического стрессового расстройства и мышей *Disc1*^{L100P/Q31L} как модели для исследования превентивных подходов к предупреждению шизофрении и лечению на продромальной стадии расстройства, что актуально для трансляционной медицины. Также полученные результаты могут применяться при подготовке лекционных курсов по физиологии, патофизиологии, этологии и нейрогенетике в высших образовательных заведениях.

Личный вклад автора в проведение исследования

Личный вклад автора состоит в получении экспериментальных групп животных, проведении всех поведенческих тестов и манипуляций с животными, статистической обработки данных.

Публикации. По теме диссертации опубликованы 16 работ, из них 6 – статьи в рецензируемых зарубежных журналах, 10 тезисов на всероссийских (6) и международных (4) конференциях.

Структура и объем работы. Диссертация включает в себя введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и обсуждение, заключение, выводы и список литературы (159 источника). Общий объем составляет 95 страниц, в том числе 26 рисунков и 1 таблицу.

Благодарности

Автор выражает благодарность своему научному руководителю д.б.н. Амстиславской Тамаре Геннадьевне и коллегам: д.б.н. Т.В. Липиной, д.б.н. Н.И. Дубровиной, д.б.н. М.А. Тихоновой, к.б.н. М.В. Тендитнику, К.С. Павлову, К.В. Смирновой и С.А. Татауровой.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проводили на 3-3,5 месячных мышах четырех генотипов: гетерозиготные самцы и самки *Disc1*-L100P (L100P-het), *Disc1*-Q31L (Q31L-het), компаунд-гетерозиготы *Disc1*^{L100P/Q31L} (две группы в зависимости от генотипа матери: гомозиготы *Disc1*-L100P или *Disc1*-Q31L; соответственно, группы L100P(f)/Q31L(m) или Q31L(f)/L100P(m)) и мыши линии *C57BL/6* (дикий тип, WT). Также в ряде экспериментов (угашение УРПИ; введение STEP-блокатора) использовали гомозиготных мышей данных линий. Для получения данных экспериментальных групп были взяты гомозиготные мыши

двух мутантных линий и дикого типа из УНУ «Биологическая коллекция – генетические биомодели нейropsychических заболеваний» (№ 493387) НИИ нейронаук и медицины. Мышей содержали в виварии НИИНМ в стандартных лабораторных условиях со световым режимом 12:12 и свободным доступом к пище и воде. Все эксперименты проводили с соблюдением условий работы с животными в соответствии с международными нормами (Council of the European Communities Directive 86/609/EES) и были одобрены Локальным этическим комитетом НИИНМ.

Для фенотипирования мышей с двумя мутациями в гене *Disc1* эксперимент был разделен на три этапа с использованием разных мышей в исследуемых группах в последовательности: 1) «приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ), «открытое поле» (ОП), тест на выработку УРПИ; 2) тест на социальную мотивацию и распознавание, тест «вынужденное плавание», тест на сенсорно-моторную фильтрацию информации (РПИ); 3) тест на закапывание шариков, «Т-образный лабиринт», латентное торможение (LI). В группах было по 7-10 мышей, при этом в ПКЛ и ОП – до 12 особей.

Для оценки поведения животных в эксперименте с ω -3-ПНЖК-обогащенной диетой тесты проводили в следующей последовательности: ПКЛ, ОП, «Т-образный лабиринт», тест на социальную мотивацию, «подвешивание за хвост», РПИ и тест на память страха. Влияние блокатора STER на поведение гомозиготных мышей линии *Disc1*-L100P исследовали на разных животных в тестах ОП, РПИ и LI. В группах (WT + физраствор; WT + препарат; L100P-hom + физраствор; L100P-hom + препарат) было по 7-10 самцов. Угашение УРПИ у гомозиготных мышей изучали отдельно от других экспериментов на 6 группах по 12 животных: самцы и самки WT, L100P-hom и Q31L-hom. Тест «вероятностное обучение при 80%-ном вознаграждении» проводился на самцах мышей с мутацией L100P (гомо- и гетерозигот) и WT. В группах было по 7-11 особей.

Статистический анализ результатов проводили с помощью пакета программ Statistica10 для Windows 8. Для определения нормальности распределения данных использовали критерий Шапиро-Уилка. При нормальном распределении ($p > 0,05$) сравнивали средние значения с помощью двух- и трехфакторного анализа переменных (MANOVA) (с повторными измерениями для тестов на социальную мотивацию и РПИ) и последующим post-hoc анализом с применением LSD критерия Фишера (для теста «вероятностное обучение» применяли t-критерий Стьюдента). В случае отсутствия нормального распределения ($p < 0,05$) применяли непараметрический ранговый анализ Краскела-Уоллиса в тесте на память страха, а в эксперименте с угашением УРПИ использовали критерий Фридмана для связанных выборок для анализа латентного периода

перехода в программе STATISTICA 10, после чего проводили попарные сравнения этого времени между тестированиями при помощи критерия Дарбина-Коновера в программе Jamovi (версия 2.2.5). Данные представлены как Mean±S.E.M. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние мутаций *Disc1-L100P* и *Disc1-Q31L* в гомозиготном состоянии на выработку УРПИ и её угашение

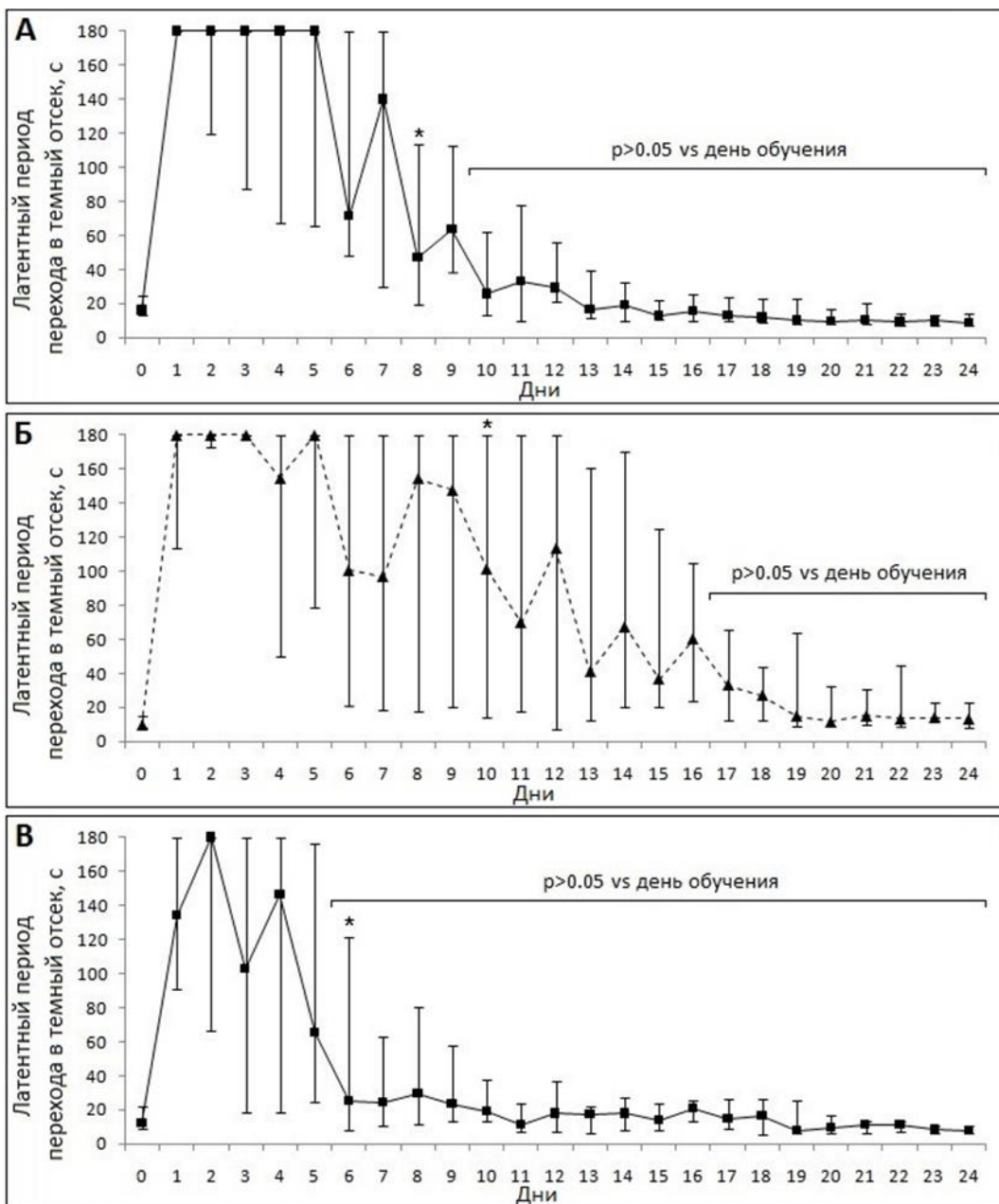
Ранее у двух данных линий были исследованы особенности формирования памяти о страхе (выработка условного рефлекса пассивного избегания, УРПИ), однако процесс её угашения не изучался. Несмотря на то, что долговременная память в водном лабиринте Морриса у данных линий не была нарушена, угашение памяти, связанной с болью, может иметь отличия. При анализе латентного периода перехода в течение 24 дней после обучения критерием Фридмана было показано влияние повторных измерений для самцов и самок C57BL/6 ($\chi^2=172,50$; $df=23$; $p < 0,001$ и $\chi^2=101,57$; $df=23$; $p < 0,001$, соответственно), а также для самцов L100P-hom ($\chi^2=117,01$; $df=23$; $p < 0,001$) и Q31L-hom ($\chi^2=75,9$; $df=23$; $p < 0,001$), но не для самок этих линий ($\chi^2=32,34$; $df=23$; $p=0,09$ и $\chi^2=22,6$; $df=23$; $p=0,482$, соответственно).

Последующие попарные сравнения при помощи критерия Дарбина-Коновера позволили детальнее оценить зависимость половых различий в угашении УРПИ от генотипа мышей. Показано, что у самок C57BL/6 снижение значений латентного периода перехода относительно уровня обучения (1-й тест после обучения) происходило при 10-м тестировании ($p < 0,001$), а у самцов начиналось с 8-го теста ($p < 0,001$). У самцов L100P-hom угашение начиналось с 6-го теста ($p < 0,01$), а у самцов Q31L-hom – с 18-го теста ($p < 0,01$). Обращает на себя внимание нестабильность процесса угашения у самок L100P-hom – в периоды 6-11, 13, 15, 16, 18, 20-24 дни их латентный период захода в темный отсек статистически значимо отличался от значения в первый день тестирования. При этом у самок Q31L-hom не обнаружено начала процесса угашения.

Оценка времени достижения полного угашения, когда значения латентного периода перехода при тестировании не отличались от показателей в день выработки рефлекса ($p > 0,05$), также является показателем межлинейных различий процесса угашения. Показано, что у самцов C57BL/6 полное угашение наступило при 10-м тестировании, а у самцов L100P-hom – при 6-м, то есть у последних наблюдается ускоренное угашение. Однако, у самцов Q31L-hom оно произошло при 19-м тесте, что отражает задержку

угашения. У самок C57BL/6 полное угашение произошло при 17-м тесте ($p>0.05$), но у самок же мутантных линий даже после 24 «напоминаний» контекста экспериментальной установки значения латентного периода перехода достоверно отличались от данных в день выработки рефлекса ($p<0.05$), то есть полного угашения УРПИ не произошло.

Таким образом, мутация *Disc1-L100P* в гомозиготном состоянии приводила к ускоренному угашению условной реакции пассивного избегания у самцов, тогда как у самок она вызывала нарушение динамики процесса угашения, а мутация *Disc1-Q31L* в гомозиготном состоянии приводила к задержке угашения у самцов и полному его отсутствию за период тестирования у самок (рис. 1).



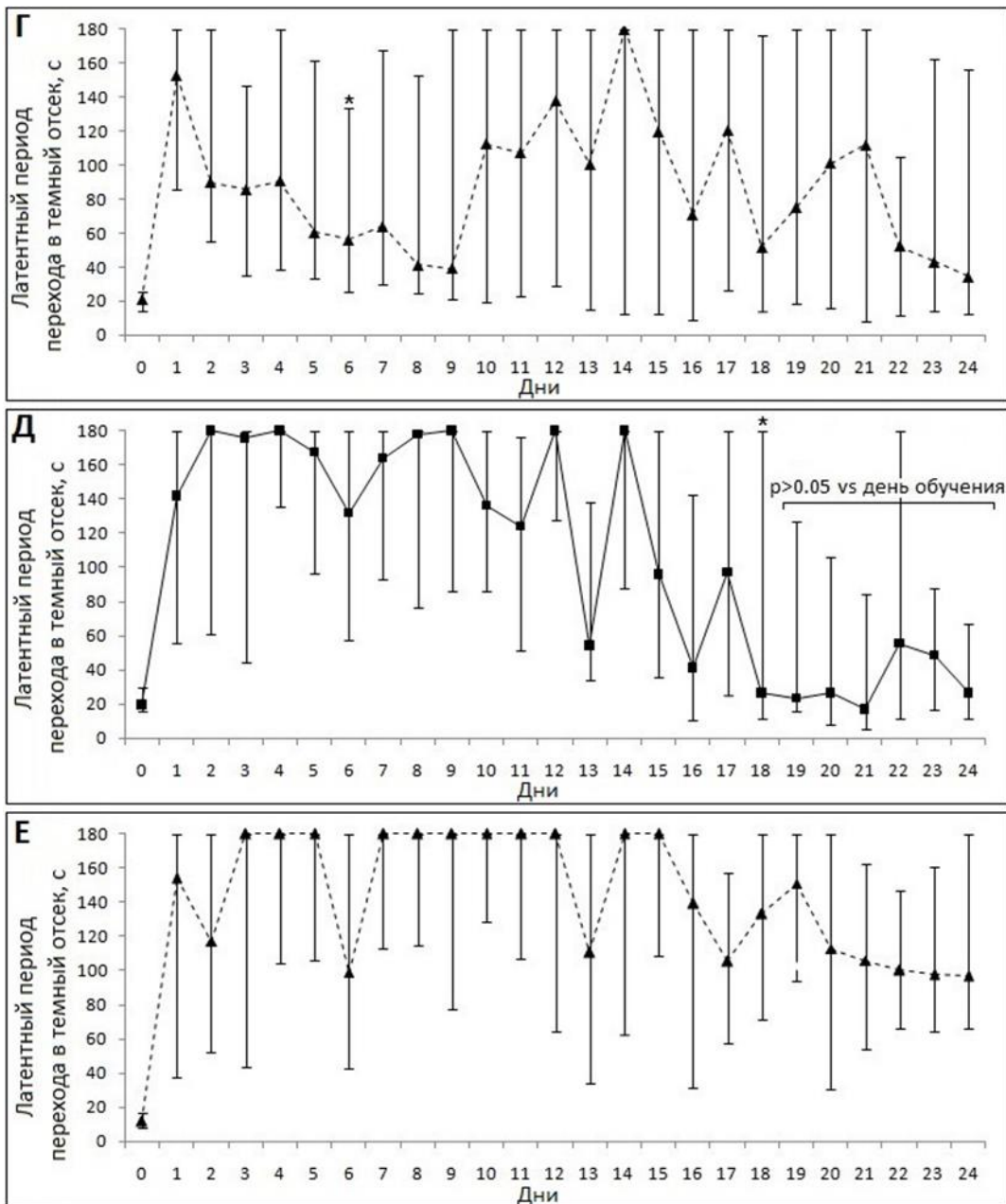


Рисунок 1. Половые и межлинейные различия угашения условной реакции пассивного избегания у мышей линий *Disc1*-L100P, *Disc1*-Q31L и C57BL/6: А – самцы C57BL/6; Б – самки C57BL/6; В – самцы *Disc1*-L100P; Г – самки *Disc1*-L100P; Д – самцы *Disc1*-Q31L; Е – самки *Disc1*-Q31L. Показаны медиана и межквартильный размах (усы). * – $p < 0.05$ по сравнению с первым днем тестирования (показано только начало угашения – то есть первый такой день); также показаны дни полного угашения условной реакции пассивного избегания ($p > 0.05$ по сравнению с днем обучения).

Влияние сочетания мутаций L100P и Q31L в гене *Disc1* на поведение мышей

Для оценки шизофреноподобного поведения широко применяли тест «престимульное торможение реакции вздрагивания» (PPI), основанный на особенностях

сенсорно-моторной фильтрации информации в мозге. В данной работе анализ результатов PPI с помощью повторных измерений ANOVA выявил эффекты генотипа ($F(4,74)=7,6452$; $p<0.0001$) и престимулов ($F(3,222)=97,6135$; $p<0.0001$) на PPI. Анализом post-hoc обнаружены снижение PPI у самцов и самок генотипа Q31L(f)/L100P(m) относительно дикого типа (при всех престимулах; $p<0.05$; рис. 2).

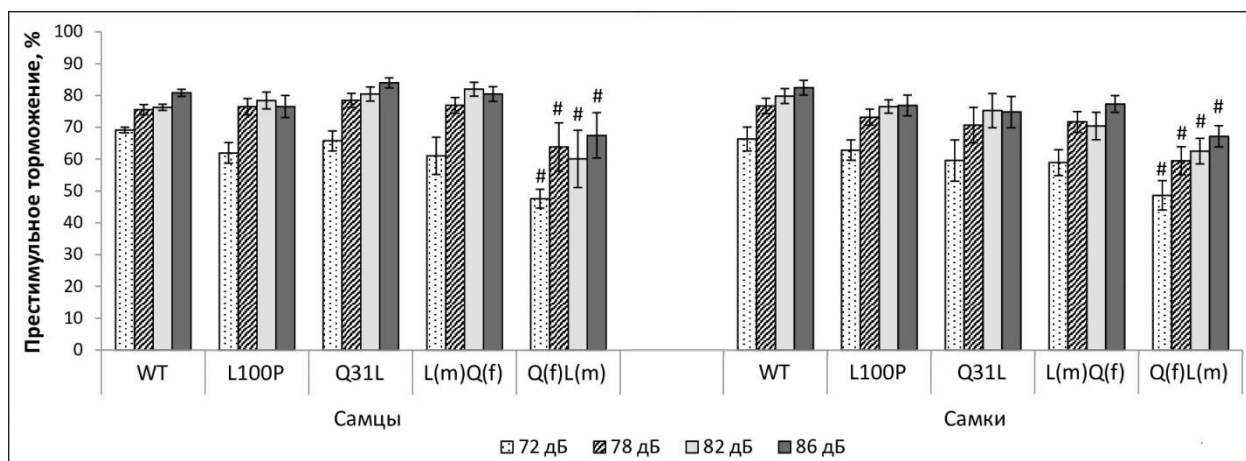


Рисунок 2. Престимульное торможение реакции вздрагивания у мутантных по *Disc1* мышей в сравнении с диким типом. # – $p<0.05$, по сравнению с WT.

Отсутствие различий между PPI гетерозигот и WT свидетельствует о том, что наличия одной мутации недостаточно для изменения этого показателя при выбранной громкости престимулов. Однако мыши, несущие мутации Q31L и L100P, оказались предрасположенными к нарушению процессов фильтрации информации, что реализовывалось в зависимости от материнского окружения и независимо от пола.

В более специфичном на шизофреноподобное поведение тесте LI трехфакторным ANOVA выявлены эффекты генотипа ($F(6,217)=4,301$; $p<0.001$), пола ($F(1,217)=7,421$; $p<0.01$) и условий ($F(1,217)=26,7347$; $p<0.0001$). Дальнейший post-hoc анализ показал различия (рис. 3): самки L100P-het из группы с преэкспозицией замирали меньше дикого типа, а самцы Q31L-het – больше; самки L100P-het без преэкспозиции и WT с преэкспозицией замирали больше самцов; разница между группами с ПЭ и БПЭ найдена у гетерозиготных самок L100P и компаунд-гетерозигот Q31L(f)/L100P(m) ($p<0.05$).

Ещё одним часто наблюдаемым в моделях шизофрении нарушением поведения является дефицит рабочей памяти, однако мыши в данном исследовании не показали статистически значимых различий в спонтанном чередовании рукавов в T-образном лабиринте ($p>0.05$).

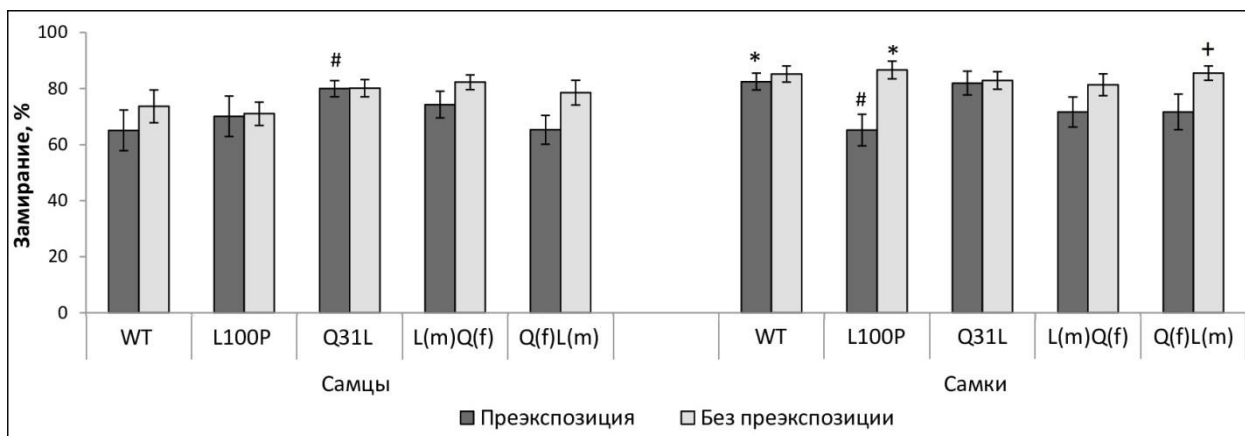


Рисунок 3. Латентное торможение у мутантных по *Disc1* мышей в сравнении с диким типом. # – $p < 0.05$, по сравнению с WT; * – $p < 0.05$, по сравнению с самцами; + – $p < 0.05$, по сравнению с группой с преэкспозицией.

Для выявления депрессивноподобного поведения проанализировали продолжительность замирания мышей в тесте «вынужденное плавание», для которой ANOVA показал влияние генотипа ($F(4,65)=6,7699$; $p < 0.001$). Post-hoc анализ обнаружил меньшее время замирания у самцов Q31L-het по сравнению с самцами дикого типа ($p < 0.05$; рис. 4). Самки Q31L-het ($p < 0.05$), Q31L(f)/L100P(m) и L100P(f)/Q31L(m) также замирали меньше, чем самки WT ($p < 0.01$).

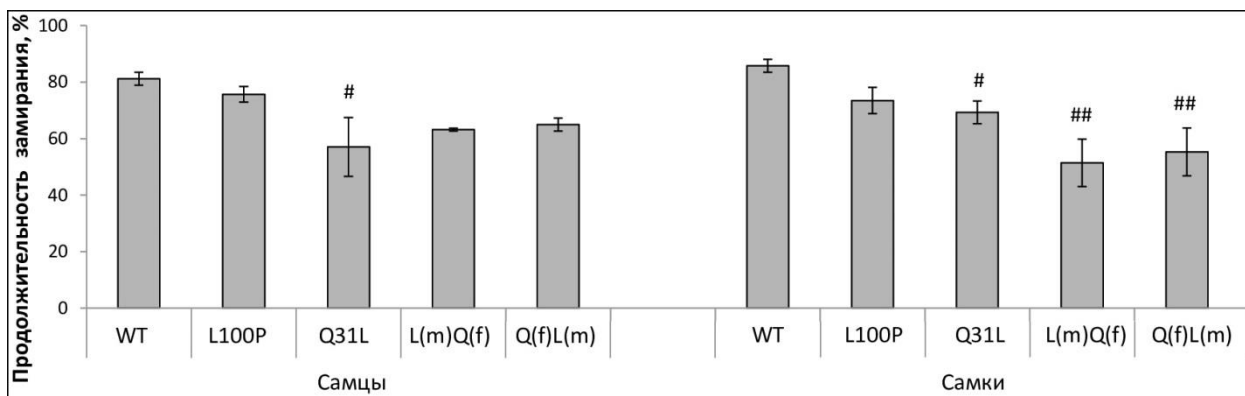


Рис. 4. Продолжительность замирания в тесте вынужденного плавания у мутантных по *Disc1* мышей в сравнении с диким типом. # – $p < 0.05$, ## – $p < 0.01$ по сравнению с WT.

В отличие от гомозиготных, гетерозиготные мыши проводят меньше времени в неподвижности, что говорит о неоднозначном влиянии данной мутации в гетерозиготном

состоянии на эмоциональный статус животных. Сочетанное же влияние мутаций *Disc1*-Q31L и *Disc1*-L100P проявлялось у самок вне зависимости от материнского окружения.

Анализ ANOVA обнаружил влияние взаимодействия генотипа и пола ($F(4,62)=3,2469$; $p<0.05$) на количество полностью закопанных шариков. Post-hoc анализ показал, что самцы Q31L(f)/L100P(m) и самки L100P(f)/Q31L(m) закапывали больше шариков, чем: мыши дикого типа того же пола; мыши этого же генотипа другого пола; мыши того же генотипа и пола, но от матерей с другим генотипом ($p<0.05$; рис. 5).

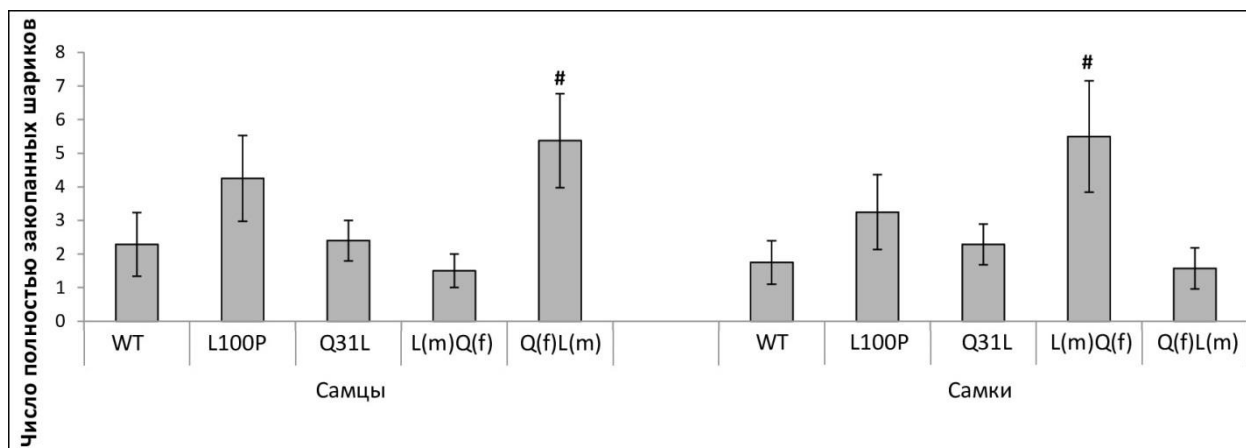


Рисунок 5. Количество закопанных шариков (в штуках) у мутантных по *Disc1* мышей в сравнении с диким типом. # – $p<0.05$, по сравнению с WT.

Для того чтобы исключить влияние на данные тестов «вынужденное плавание» и «закапывание шариков» нарушений локомоторной активности, был проведен тест «открытое поле». Отличий в горизонтальной активности не было показано ($p>0.05$).

Коррекция шизофреноподобного поведения мутантных по гену *Disc1* мышей с помощью диеты, обогащенной ω -3 ПНЖК

В тесте «подвешивание за хвост» ANOVA обнаружил влияние генотипа [$F(3,129) = 2,954$; $p<0.05$]. На экспериментальной диете только самцы L100P/Q31L показали меньшее замирание относительно WT ($p<0.01$; рис. 6).

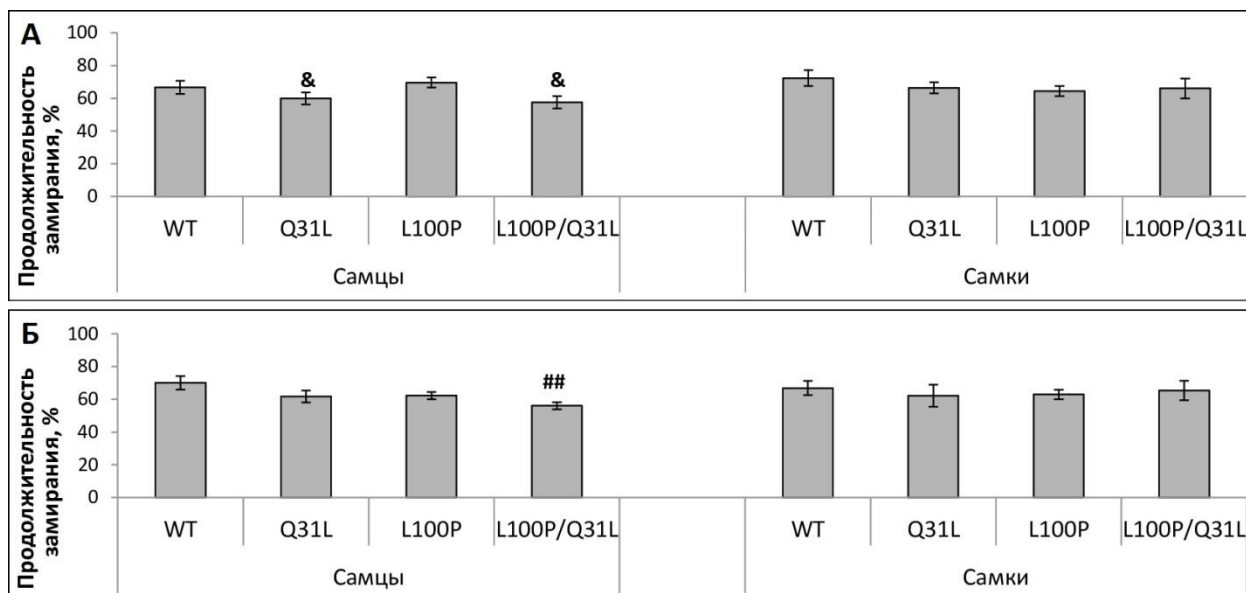


Рис. 6. Продолжительность замирания при подвешивании за хвост у мутантных по *Disc1* мышей на контрольной (А) и экспериментальной диетах (Б) в сравнении с диким типом. ## – $p < 0.01$ по сравнению с WT; & – $p < 0.05$ по сравнению с L100P.

В тесте PPI RMANOVA выявил эффекты генотипа [$F(3,123)=4,795$; $p < 0.01$], диеты [$F(1,123)=1,061$; $p < 0.01$] и престимулов [$F(3,369)=192,058$; $p < 0.001$], а также взаимодействия генотип×диета [$F(3,123)=4,464$; $p < 0.01$]. Post-hoc анализ данных мышей на обогащенной ω -3 ПНЖК диете показал повышение торможения реакции вздрагивания у мышей: самки и самцы WT в ответ на сигналы 78, 82 и 86 дБ ($p < 0.01$; и самцы WT на 72 дБ – $p < 0.05$; рис. 7); самки L100P-het в ответ на стимулы мощностью 72, 86 ($p < 0.01$) и 82 дБ ($p < 0.05$); самцы L100P/Q31L в ответ на 72, 86 ($p < 0.05$) и 82 дБ ($p < 0.01$). Влияния диеты на самцов Q31L-het и L100P-het и самок Q31L-het и L100P/Q31L не обнаружено ($p > 0.05$).

На экспериментальной диете самки L100P/Q31L показали сниженное торможение реакции вздрагивания относительно WT в ответ на сигнал 78 и 82 дБ ($p < 0.05$), а также в ответ на 82 дБ по сравнению с самцами ($p < 0.01$), которые в свою очередь показали большее торможение, чем самцы L100P-het ($p < 0.05$).

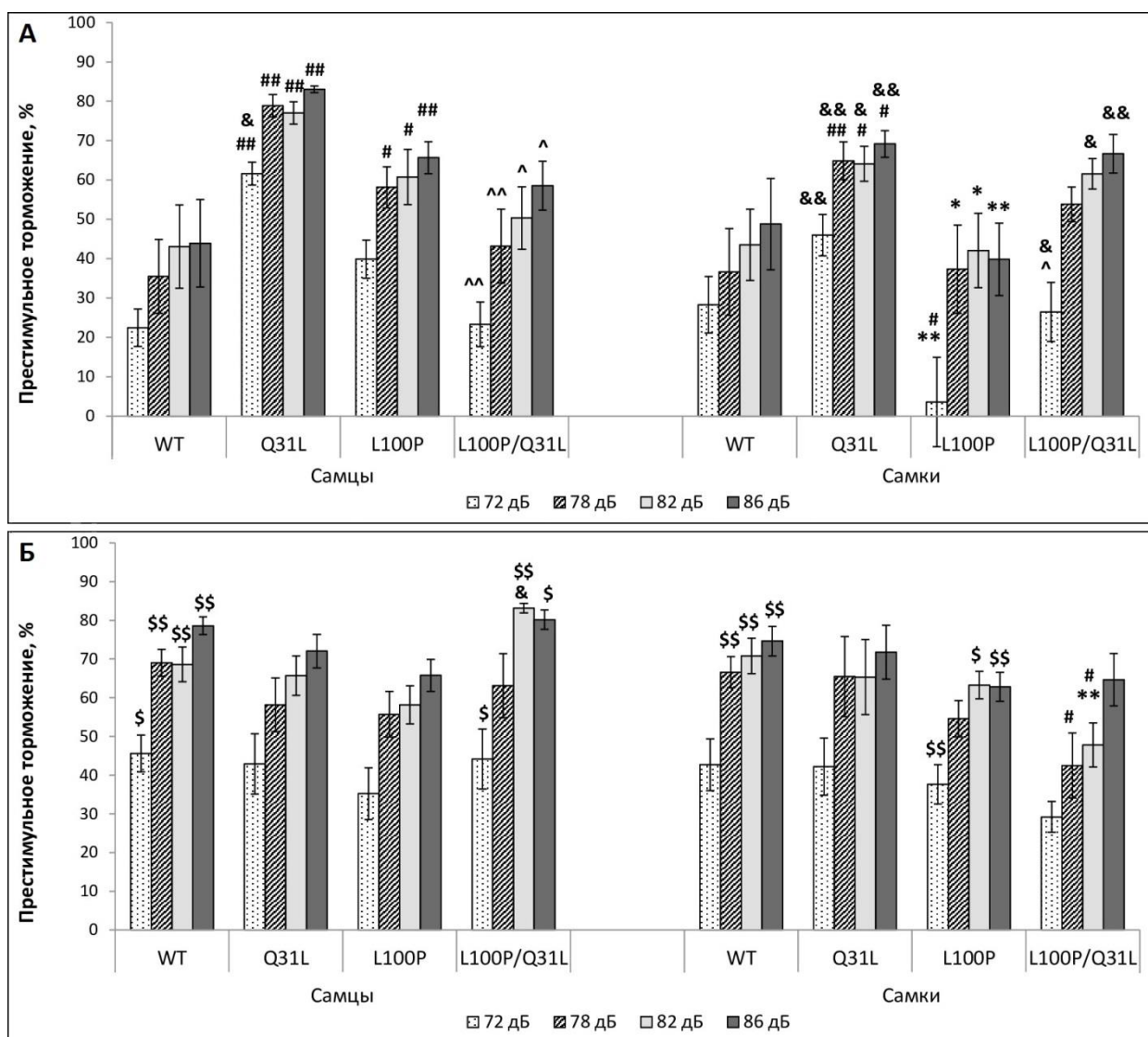


Рис. 7. Престимульное торможение реакции вздрагивания у мутантных по *Disc1* мышей на контрольной (А) и экспериментальной диетах (Б) в сравнении с диким типом. * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$ по сравнению с самцами; # – $p < 0.05$, ## – $p < 0.01$ по сравнению с WT; ^ – $p < 0.05$, ^^ – $p < 0.01$ по сравнению с Q31L; & – $p < 0.05$, && – $p < 0.01$ по сравнению с L100P; \$ – $p < 0.05$, \$\$ – $p < 0.01$ по сравнению с мышами на контрольной диете.

В тесте на выработку УРПИ не обнаружено статистически значимых различий в латентном времени перехода в темный отсек ($p > 0.05$).

Коррекция шизофреноподобного поведения мутантных по гену *Disc1* мышей с помощью блокатора STEP

В открытом поле MANOVA выявил влияние генотипа [$F(1,21)=7,1$; $p < 0.001$] и препарата [$F(1,21)=8,1$; $p < 0.001$] на основной показатель двигательной активности (пройденный путь). Введение TC-2051 снизило двигательную активность у мышей обоих

генотипов в сравнении с контролем ($p < 0.01$), что приблизило значение у L100P-гом к значению у дикого типа без препарата ($p > 0.05$).

RMANOVA выявил влияние генотипа [$F(1,28)=4,693$; $p < 0.05$] и престимулов [$F(3,84)=51,842$; $p < 0.05$] на PPI, тогда как влияние ТС-2051 проявилось на уровне тенденции [$F(1,28)=3,845$; $p = 0,0599$]. Мыши L100P-гом показали сниженное PPI относительно дикого типа ($p < 0.05$; рис. 8), а введение ТС-2051 незначимо повышало у них этот показатель при громкости престимулов 82 и 86 дБ ($p = 0.076$). Примечательно, что на фоне введения препарата PPI у мышей L100P-гом при 86 дБ становилось неотличимым от значений у WT ($p > 0.05$).

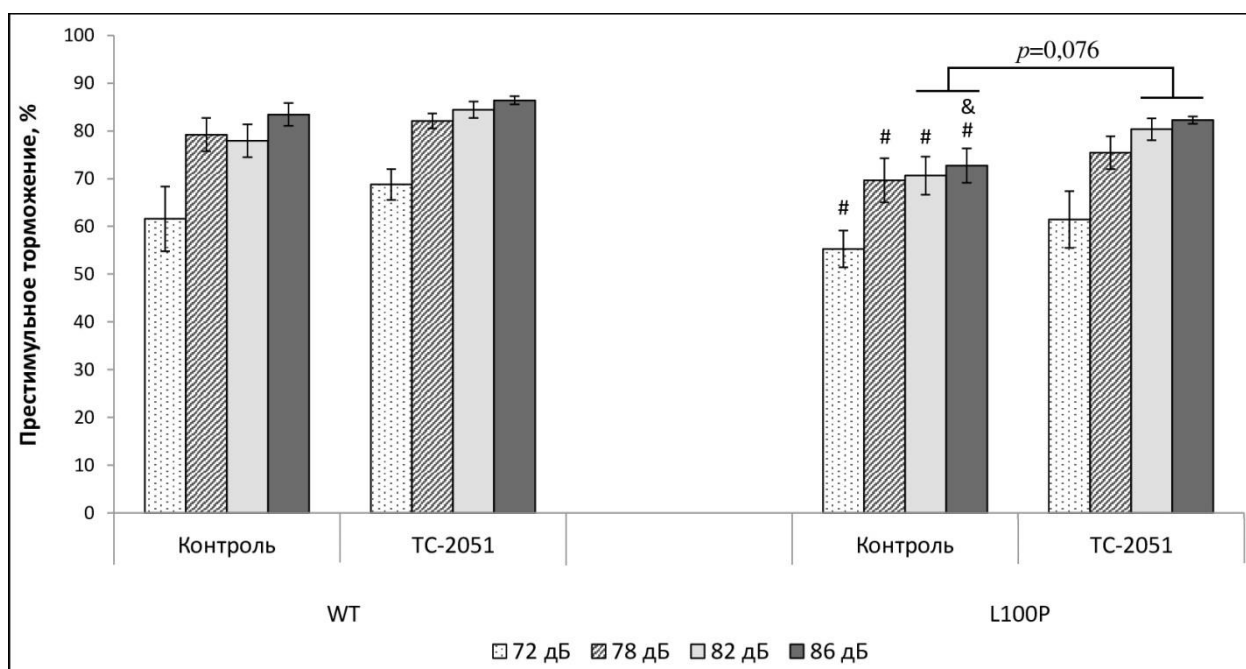


Рис. 8. Престимульное торможение реакции вздрагивания у мышей L100P-гом по сравнению с группой дикого типа при введении ТС-2051 и растворителя (контроль). # – $p < 0.05$ – по сравнению с WT-ТС2051; & – $p < 0.05$ – по сравнению с WT-контроль.

В тесте «латентное торможение» ANOVA показал влияние условий (с преэкспозицией и без) [$F(1,63)=14,433$; $p < 0.001$] на среднее время замирания мышей в ответ на звуковой стимул в течение 5 минут. Выявлены различия между группами мышей L100P-гом без и с преэкспозицией на фоне введения ТС-2051 ($p < 0.05$; рис. 9), что характерно для здоровых мышей. При анализе этого же показателя для каждого 30 секунд в указанный период времени RMANOVA подтвердил этот эффект [$F(1,63)=14,433$; $p < 0.001$], а также обнаружил влияние времени [$F(9,567)=6,3$; $p < 0.001$] на латентное торможение, однако влияния вещества не было найдено [$F(1,63)=0,0015$; $p = 0,97$].

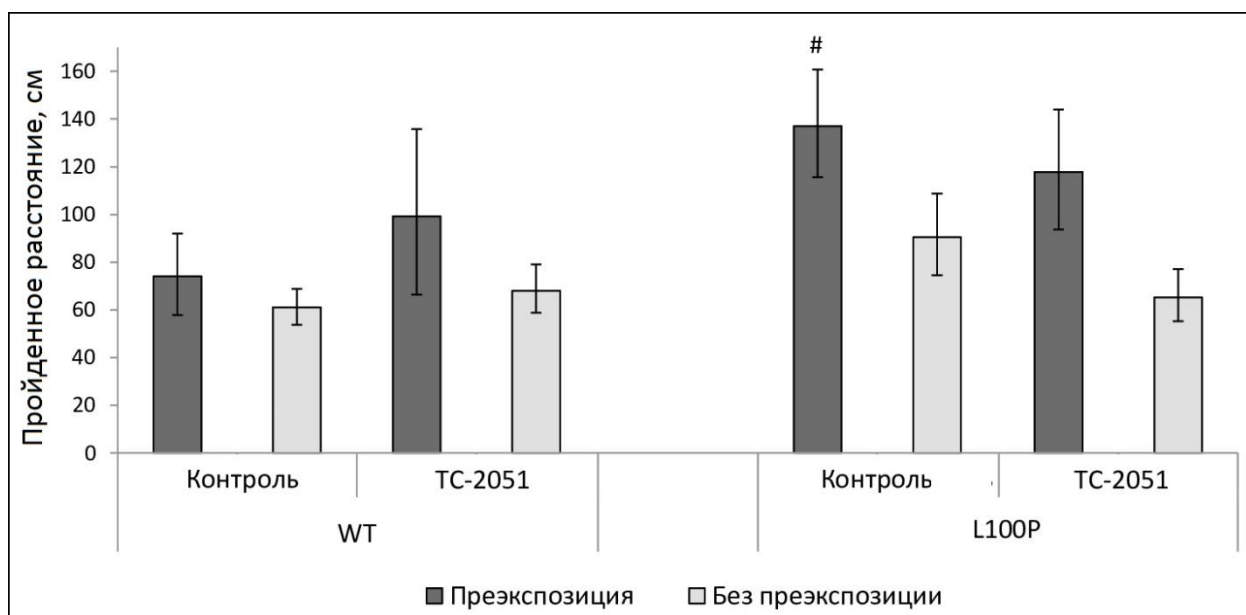


Рис. 9. Латентное торможение у мышей L100P-гом по сравнению с группой дикого типа при введении ТС-2051 и растворителя (контроль). # – $p < 0.05$ – по сравнению с WT.

Заключение

В работе исследованы нарушения поведения у мышей C57BL/6, несущих мутации L100P и Q31L в гене *Disc1*. Показано, что наличие каждой из этих мутаций по отдельности в гетерозиготном состоянии не влияло на сенсорно-моторную фильтрацию информации, рабочую память, латентное торможение памяти о страхе, двигательную активность в открытом поле и тревожность в ПКЛ. Показано, что сочетанное влияние обеих мутаций (компаунд-гетерозиготы, *Disc1*^{L100P/Q31L}) приводило к дефициту престаимпульного торможения реакции вздрагивания и у самцов, и у самок, чьими матерями были гомозиготные по *Disc1*-Q31L мыши. Этот результат позволяет предположить наличие у компаунд-гетерозигот предрасположенности к дефициту PPI, который проявляется в зависимости от внешних факторов в период раннего развития (пренатальная среда и материнское поведение). Поскольку нарушения PPI характерны для психотических расстройств и могут наблюдаться не только у больных шизофренией, но и у их здоровых родственников, а также в продромальном периоде заболевания, то такая особенность может считаться одним из клинически регистрируемых проявлений заболевания на раннем этапе течения расстройства. Таким образом, мыши *Disc1*^{L100P/Q31L} могут быть полезны при исследовании подходов к предупреждению шизофрении и её лечению на раннем этапе. Несмотря на известный из литературы депрессивный эффект мутации *Disc1*-Q31L в гомозиготном состоянии, в нашей работе гетерозиготные по ней мыши проводили меньше времени в неподвижности в тесте принудительного плавания.

Сочетанное же влияние мутаций L100P и Q31L проявлялось у самок вне зависимости от материнского окружения – обе группы (L100P(f)/Q31L(m) и Q31L(f)/L100P(m)) проводили в неподвижности меньше времени относительно дикого типа, тогда как самцы имели только тенденцию к такой разнице. Отсутствие повышенной активности в ОП говорит о том, что данные эффекты мутации *Disc1*-Q31L не связаны с локомоторными изменениями, а оказывают влияние на эмоциональную сферу поведения. Такая неоднозначность влияния данной мутации в гетерозиготном состоянии интересна для дальнейшего исследования. Расстройства эмоционального спектра, к которым относится и депрессия, часто связаны с компульсивным поведением. В нашей работе гетерозиготные мыши не показали отличий от WT в компульсивноподобном поведении, однако мыши *Disc1*^{L100P/Q31L} в зависимости от пола и материнского окружения проявляли компульсивноподобное поведение: больше шариков в тесте закапывали самцы, чьи матери были гомозиготами по *Disc1*-Q31L, и самки, чьи матери были гомозиготами по *Disc1*-L100P. Такие отличия можно объяснить ролью связанных с DISC1 процессов нейроразвития в формировании компульсивноподобного поведения, поскольку именно в пренатальном периоде проявляется как основная роль DISC1, так и расхождение по пути формирования межполовых отличий ГМ, а также уязвимость этих процессов к стрессорам внешней среды.

Полученные в работе результаты показывают, что потребление корма, обогащенного ω -3 ПНЖК (соотношение ω -3/ ω -6 составляло приблизительно 4:1), мышами *Disc1*^{L100P/Q31L} оказывало корректирующий эффект на PPI у самцов, но не самок, что подтверждает положительное влияние ω -3 ПНЖК на поведенческие дефициты.

Введение блокатора STEP TC-2051 внутривнутрибрюшинно в дозе 10 мг/кг повышало у мышей L100P-гом сниженную реакцию вздрагивания (PPI) до контрольных значений и снижало их гиперактивность в открытом поле, то есть корректировало шизофреноподобное поведение. Полученные данные свидетельствуют о перспективности использования соединений ряда бензопентатиепинов, блокирующих STEP, в качестве новых антипсихотиков.

ВЫВОДЫ

1. Наличие у мышей в гене *Disc1* мутации L100P в гомозиготном состоянии приводило к более быстрому угашению реакции страха у самцов, но задержке этого угашения у самок, в то время как наличие мутации Q31L в гомозиготном состоянии приводила к более медленному угашению у самцов и самок, вплоть до полного его отсутствия у последних.

2. Выявлен материнский эффект на проявление шизофрено- и компульсивноподобного поведения у мышей *Disc1*^{L100P/Q31L}. Одновременное наличие у мышей в гене *Disc1* мутаций L100P и Q31L в гетерозиготном состоянии приводило к шизофреноподобному поведению у самцов и самок, чьи матери были гомозиготами по мутации *Disc1*-Q31L, компульсивноподобному поведению у самцов, чьи матери были гомозиготами по *Disc1*-Q31L, и у самок, чьи матери были гомозиготами по *Disc1*-L100P, а также к уменьшению депрессивноподобного поведения у самок вне зависимости от генотипа матери.

3. Потребление мышами, несущими в гетерозиготном состоянии мутации L100P и Q31L в гене *Disc1*, корма, обогащенного ω-3 ПНЖК, вызывало увеличение показателя PPI у самцов до значений дикого типа, но не у самок.

4. Внутривентрикулярное введение блокатора STEP (шифр ТС-2051) гомозиготным мышам *Disc1*-L100P в дозе 10 мг/кг восстанавливало нарушенный PPI до контрольных значений и снижало их двигательную активность до значений у дикого типа без препарата.

СПИСОК ОСНОВНЫХ ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ

Статьи:

1. **Чижова Н.Д.**, Липина Т.В., Амстиславская Т.Г. Характеристика поведения гетерозиготных мышей с мутациями L100P и Q31L в гене *Disc1* // Лабораторные животные для научных исследований. – 2019. – Т. 3. (<https://doi.org/10.29296/2618723X-2019-03-02>)
2. **Чижова Н.Д.**, Липина Т.В., Амстиславская Т.Г. Показатели функциональной активности нервной и иммунной систем у мышей с мутациями в гене *Disc1* // Российский Иммунологический Журнал. – 2019. – Т. 13 (22), № 2. – С. 638-640.
3. **Чижова Н.Д.**, Смирнова К.В., Дубровина Н.И., Липина Т.В., Амстиславская Т.Г. Половые и линейные различия между мышами *Disc1*-L100P и C57BL/6 в угашении условной реакции пассивного избегания // Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова. – 2023. – Т. 73, № 3. – С. 425-432.
Chizhova N.D., Smirnova K.V., Dubrovina N.I., Lipina T.V., Amstislavskaya T.G. Sex- and strain-related differences in the extinction of a conditioned passive avoidance reaction in *Disc1*-L100P and C57Bl/6 mice // Neuroscience and Behavioral Physiology. – 2023. – № 8
4. Смирнова К.В., **Чижова Н.Д.**, Амстиславская Т.Г. Влияние хронического эмоционально стрессового воздействия на поведение мышей с мутациями Q31L и

- L100P в гене *Disc1* // Сибирский вестник психиатрии и наркологии. – 2023. – Т. 1, № 118. – С. 104-113. ([https://doi.org/10.26617/1810-3111-2023-1\(118\)-104-113](https://doi.org/10.26617/1810-3111-2023-1(118)-104-113))
5. Смирнова К.В., **Чижова Н.Д.**, Герасимова Е.В., Калуев А.В., Амстиславская Т.Г. Молекулярно-генетические механизмы регуляции циркадных ритмов и их роль в психопатологиях // Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. – 2023. – Т. 109, №10. Smirnova K.V., **Chizhova N.D.**, Gerasimova E.V. , Kalueff A.V. , Amstislavskaya T.G. Molecular Genetic Mechanisms of Circadian Rhythm Regulation and their Role in Psychopathology // Evolutionary Biochem. and Physiol. – 2023. – V. 56, № 6.
6. **Чижова Н.Д.**, Смирнова К.В., Дубровина Н.И., Калуев А.В., Амстиславская Т.Г. Особенности угашения памяти о страхе у самцов и самок мышей *Disc1-Q31L* // Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. – 2023. – Т. 110, №11. **Chizhova N.D.**, Smirnova K.V., Dubrovina N.I., Kaluev A.V., Amstislavskaya T.G. Peculiarities of fear memory disturbance in male and female *Disc1-Q31L* mice // Evolutionary Biochem. and Physiol. – 2023. – V. 57, № 7.

Материалы конференций:

1. **Чижова Н.Д.** Влияние диеты, обогащенной омега-3-ПНЖК, на степень выраженности нарушений поведения у *Disc1* мутантных мышей // Cognitive Neuroscience – 2019: матер. междунар. форума (Екатеринбург, 6–7 ноября 2019 г.) – Екатеринбург, 2020. – С. 88-90.
2. **Чижова Н.Д.**, Липина Т.В., Амстиславская Т.Г. Влияние сочетания мутаций *Disc1-L100P* и *Disc1-Q31L* на поведение мышей // Материалы IV Межрегионального фестиваля "Молодой профессионал Сибири" (Кызыл, 17–18 сентября 2019 г.) – Кызыл, 2019. – С. 52-53.
3. **Chizhova N.**, Smirnova K. Compulsive-like behaviors in *Disc1*-mice // The Twelfth International Multiconference «BIOINFORMATICS OF GENOME REGULATION AND STRUCTURE/SYSTEMS BIOLOGY (BGRS/SB-2020)» (Novosibirsk, 06–10 July, 2020) – Novosibirsk, 2020. – P. 278-279
4. **Чижова Н.Д.** Исследование влияния блокатора STEP (ТС-2051) на проявления шизофреноподобного поведения у мышей линии *Disc1-L100P* // Третий Всероссийский Конгресс молодых ученых с международным участием «Актуальные вопросы фундаментальной и клинической медицины» (Томск, 26–27 мая, 2022 г.) – Томск, 2019. – С. 90-93

5. **Чижова Н.Д.** Исследование влияния мутации в гене *Disc1* (L100P) на вероятностное обучение у мышей // 60-я Международная научная студенческая конференция (МНСК-2022) (Новосибирск, 10–20 Апреля, 2022 г.) – Novosibirsk, 2022. – С. 151
6. **Chizhova N., Khomenko T., Volcho K., Amstislavskaya T.** Antipsychotic activity of a new PTPN5 blocker (TC-2051) in mice with the *Disc1*-L100P mutation // The Thirteenth International Multiconference «BIOINFORMATICS OF GENOME REGULATION AND STRUCTURE/SYSTEMS BIOLOGY (BGRS/SB-2022)» (Novosibirsk, 04–08 July, 2022) – Novosibirsk, 2022. – P. 733-734
7. **Чижова Н.Д.** Вклад мутации Q31L в гене *Disc1* в угашение условной реакции пассивного избегания у мышей // V Российская конференция с международным участием «Современные проблемы биологической психиатрии и наркологии» (Томск, 17–18 мая, 2023 г.) – Томск, 2023. – С. 237-239
8. Амстиславская Т.Г., Смирнова К.В., **Чижова Н.Д.** Влияние хронического эмоционально-стрессового воздействия на поведение мышей с мутациями Q31L и L100P в гене *Disc1* // V Российская конференция с международным участием «Современные проблемы биологической психиатрии и наркологии» (Томск, 17–18 мая, 2023 г.) – Томск, 2023. – С. 8-10
9. **Чижова Н.Д.,** Смирнова К.В. Влияние материнской среды на поведение гетерозиготных по *Disc1*-L100P И *Disc1*-Q31L мышей // XXIV съезд Физиологического Общества им. И.П. Павлова (Санкт-Петербург, 11-15 сентября, 2023 г.) – Санкт-Петербург, 2023 . – С. 214 – 215.
10. Смирнова К.В., Нехорошев Е.В., **Чижова Н.Д.,** Амстиславская Т.Г. Влияние мутаций Q31L и L100P в гене *Disc1* на экспрессию белка VMAL1 в мозге мышей // XXIV съезд Физиологического Общества им. И.П. Павлова (Санкт-Петербург, 11-15 сентября, 2023 г.) – Санкт-Петербург, 2023. – С. 217.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ГМ – головной мозг

ОП – тест «открытое поле»

ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты

ПКЛ – приподнятый крестообразный лабиринт

УРПИ – условная реакция пассивного избегания

ЦНС – центральная нервная система

DISC1 (Disrupted-In-Schizophrenia-1) – «нарушенный-при-шизофрении-1»

L100P/Q31L, *Disc1*^{L100P/Q31L} – мыши, компаунд-гетерозиготы, содержащие в одной аллели мутацию *Disc1*-L100P, а в другой – *Disc1*-Q31L

L100P-het – мыши, гетерозиготные по мутации *Disc1*-L100P и аллели дикого типа

L100P-hom – гомозиготные по мутации *Disc1*-L100P мыши

L(m)Q(f), L100P(f)/Q31L(m) – мыши, компаунд-гетерозиготы, содержащие в одной аллели мутацию *Disc1*-L100P от матери, а в другой – *Disc1*-Q31L от отца

LI (latent inhibition) – латентное торможение

PPI (prepulse inhibition) – престаимпульное торможение реакции вздрагивания

Q31L-het – мыши, гетерозиготные по мутации *Disc1*-Q31L и аллели дикого типа

Q31L-hom – гомозиготные по мутации *Disc1*-Q31L мыши

Q(f)L(m), Q31L(f)/L100P(m) – мыши, компаунд-гетерозиготы, содержащие в одной аллели мутацию *Disc1*-Q31L от матери, а в другой – *Disc1*-L100P от отца

СТЕР – (striatal-enriched protein tyrosine phosphatase) – стриатумспецифичная протеин тирозинфосфатаза, кодируемая геном *PTPN5*

WT – мыши дикого типа, линия C57BL/6NCrl

Соискатель Н.Д. Чижова